

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15447

研究課題名(和文)1細胞イメージングを使った放射線照射細胞の運命決定の解析

研究課題名(英文)Analysis of individual fate determination of irradiated cells by using live cell imaging technique

研究代表者

新美 敦子(Niimi, Atsuko)

群馬大学・未来先端研究機構・助教

研究者番号：50508984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ライブセルイメージングでDNA損傷と細胞周期を同時にモニタリングできる細胞株を樹立し、X線及び重粒子線照射後120時間以上のタイムラプス実験を行った。X線照射細胞では照射後複数回の細胞分裂により重篤なゲノム不安定化が増加し、細胞死に至った。一方重粒子線照射細胞では、照射後すぐの細胞分裂後から効率的に細胞死が引き起こされ、更に細胞分裂自体もX線照射に比べて抑制された。これらの結果から、X線照射細胞では、照射後の細胞分裂を通じた細胞周期進行に伴って一定期間後にその生死の運命決定がなされるのに対し、重粒子線照射細胞では、照射直後に細胞死に向かう運命決定がなされている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We established a cell line for monitoring DNA damages with cell cycle status to applied live cell imaging microscopy over 120 h as a more direct approach for tracking cell fate after irradiation.

The time-lapse experiments showed that X-ray irradiated cells were required to pass a couple of cell cycle to undergo cell death (CD), however interestingly, C-ion induced CD were mostly occurred at the interphase following 1st mitosis. Also, the number of total mitosis after C-ion irradiation is much decreased than that after X-rays irradiation. These data suggest that C-ion irradiation causes lethal damages before the completion of 1st mitosis so that the fate of C-ion irradiated cells is decided to die at the time. In contrast, X-ray irradiated cells traverse the cell cycle and enter mitosis in the presence of unrepaired or misrepaired DSBs, consequently, chromosomal aberrations are accumulated, resulting in cell lethality with cell cycle progressions.

研究分野：DNA損傷応答

キーワード：ゲノム不安定化 重粒子線 ライブイメージング 染色体異常 医学放射線生物学

1. 研究開始当初の背景

放射線により誘発される DNA 二本鎖切断 (DNA double strand break:DSB) 研究は、DNA 損傷応答タンパク質を蛍光顕微鏡において可視化することによって大きく発展してきた。さらに細胞周期マーカーやクロマチンマーカーと共染色することにより、細胞周期特異的な修復経路やクロマチン構造変換に必要な修復タンパク質が数多く発見された。しかしながら固定細胞を用いた実験では、DNA 損傷を受けた個々の細胞が辿る細胞運命を知ることは困難であった。例えば、放射線照射を受けた G2 細胞の大部分は G2/M チェックポイントにより一旦停止するが、ごく一部の細胞は回避することが知られている。回避してしまった場合、M 期において anaphase bridge の形成や分裂期崩壊、M 期回避など様々な運命を辿ることが想定される。従来の固定細胞を用いた実験では、細胞集団の中でのこれら運命決定の「割合」を測定することはできたが、一連の経路進行をモニタリングすることはできなかった。そこで、長時間ライブセルイメージング観察を用い、放射線照射を受けた細胞集団の細胞運命決定がどのようになされるのかを個々の細胞に注目して解析することで、これまでの基礎研究から一歩前進した包括的細胞応答の理解につながる可能性があるのではないかと考えた。生存細胞の運命決定経路選択機構の解析により、放射線耐性の正常細胞の存在と特性を明らかにするだけでなく、更にはがん細胞を同様の系で解析することで、がん治療耐性細胞の性質と特性を明らかにし、がん細胞殲滅へ向けた治療戦略を提案できるのではないかと考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

群馬大学が新たに導入した次世代 3D 超解像度顕微鏡 Deltavision OMX を用いて長時間ライブセルイメージング観察を行い、放射線照射を受けた細胞集団の中で、どのような細胞が、どのような経路を経て生存、または死への道を進んだかを、DNA 修復とチェックポイントの連携とあわせて追跡し、生存細胞の細胞運命決定までの経路を同定する。

3. 研究の方法

長時間タイムラプスでは、タンパク質の蛍光ラベル減衰が問題となるため、基質を随時添加することで蛍光シグナル減衰を大幅に防ぐことが可能な SNAP タグを選択した。SNAP-53BP1 及び SNAP-Ku80 発現ベクターを構築し、U2OS 細胞に導入して安定発現細胞株を取得した。放射線照射後に SNAP-53BP1 が効率よく DSB 部位に集積することを確認後、mCherry-Geminin 発現ベクターを更に導入し、DNA 損傷シグナルと細胞周期の判別を同時にモニタリングできる SNAP-53BP1/ mCherry-Geminin 安定発現細胞株を樹立した。得られた細胞株を使用して長時間タイム

ラプス観察を行った。細胞を播種して 48 時間後に 1 Gy の X 線 (100kV) または炭素線 (LET:70keV/μm) 照射を行った。炭素線の照射時は炭素粒子の軌跡に沿った DNA 損傷を検出するために、炭素線照射方向と細胞接着面の傾斜が 5 度となるスライドホルダーを使用した。照射 30 分後に蛍光シグナルにより DNA 損傷と細胞周期の情報を取得し、その後 15 分おきに 120 時間の位相差画像を取得した。終了後に再び蛍光シグナルによる DNA 損傷と細胞周期の情報を取得した。得られた個々の観察画像は BZ-II Analyzer software を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 長時間タイムラプス観察実験系の確立。

まず、長時間タイムラプス実験系の最適化を検討した。放射線照射後の細胞生存もしくは死を判定するため、細胞分裂 3 回以上、100 時間以上の観察を行うことができる実験系の確立を目指した。条件検討により、従来の蛍光タンパク質ラベル法では長時間の観察は困難であることが明らかとなったため、非退色性蛍光基質を添加することで蛍光シグナルを強固に維持する SNAP タグに切り替えた。SNAP-53BP1 及び SNAP-Ku80 安定発現細胞を作製し、Deltavision OMX にてタイムラプス観察の条件検討を行い、個々の細胞に対して放射線照射やレーザー照射により生じた DSB 部位の長時間モニタリングが可能となる実験系を作製した。一方で、放射線照射した細胞集団において最終的に生存または死となる細胞を長期間追跡するためには、一度に一定数以上の細胞を同時に観察し続ける必要があることが明らかとなった。OMX は個々の細胞の長時間ライブセルイメージングには最適だが、観察視野が狭いことから、多数の細胞の同時観察は困難であることが明らかとなったため、本研究での使用を断念し、機器を HS BZ-9000E 変更して実験を継続した。細胞生存に最もストレスがかからない条件を各種検討し、蛍光シグナルの取得回数を最小限に抑え、主に位相差画像を解析に用いることで、放射線非照射細胞を用いたコントロール実験において 120 時間以上 (細胞分裂 4-5 回) の継時的観察が可能なる系を確立した。(2) 放射線照射後の細胞運命決定機構の解析

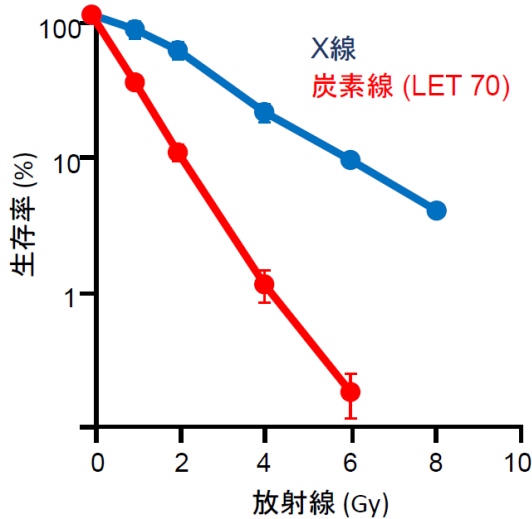
表1 放射線照射細胞の挙動

	0 Gy	1 Gy		4 Gy	
		X線	炭素線	X線	炭素線
細胞数 (開始時)	49	80	145	129	178
細胞数 (120時間後)	219 (x4.47)	221 (x2.76)	176 (x1.21)	84 (x0.65)	71 (x0.40)
細胞死	23	60	112	43	40
分裂回数	227 (4.63/cell)	273 (3.41/cell)	231 (1.59/cell)	47 (0.36/cell)	17 (0.10/cell)

X 線または炭素線照射後の細胞の挙動を、確立した長時間タイムラプス実験系を用い

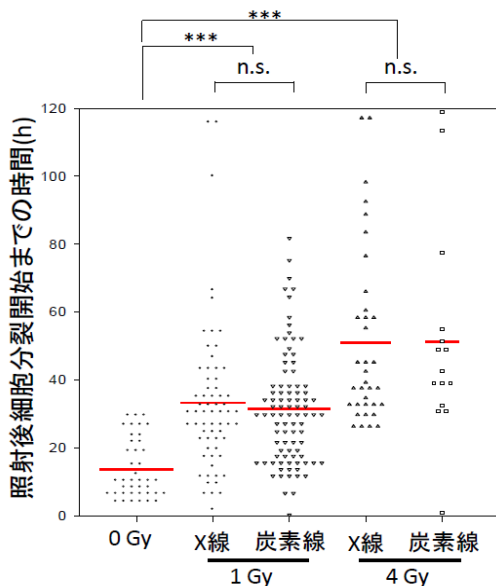
て解析を行った。120 時間の間に放射線照射を受けた細胞集団中での細胞死数を測定したところ、測定開始時の細胞数に対する致死細胞数の割合は、X 線と炭素線間ではほとんど差は見られなかった。一方で、120 時間後の細胞数を比較したところ、炭素線照射細胞では、X 線照射細胞に比べ、細胞数の増加抑制が観察された(表 1)。炭素線は X 線に比べ、

**図1 炭素線とX線に対する生存曲線**



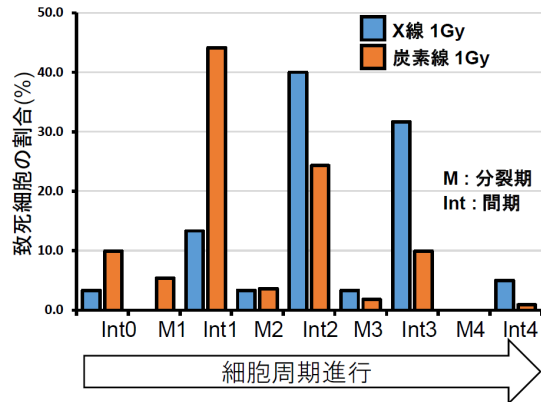
高い殺細胞効果を持っていることが広く知られており、本実験で用いた細胞株でも、X 線に比べ炭素線では約 3 倍の殺細胞効果であることがコロニーフォーメーションアッセイを用いた予備実験により示されている(図 1)。しかし、タイムラプス実験の結果では炭素線照射細胞では、細胞死が誘導される割合では X 線照射細胞と差異が見られなかったにもかかわらず、最終的な細胞数の増加が抑制されていることから、X 線と炭素線の間では照射後における細胞の運命決定の経路が

**図2 放射線照射後の細胞分裂**



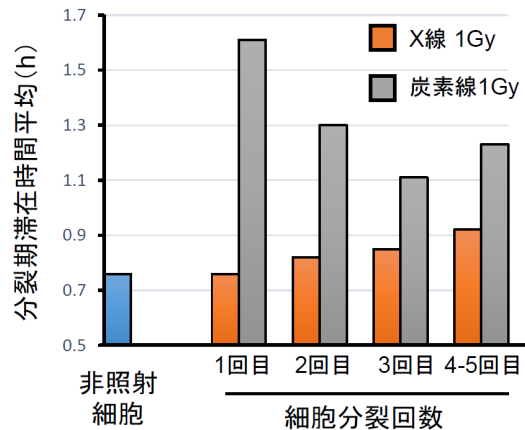
違う可能性を考え、更なる解析を行った。(3) 放射線照射細胞の細胞周期進行に伴う細胞死の解析

**図3 放射線照射後の細胞死**



炭素線照射後の細胞数増加抑制における細胞死以外の可能性として、細胞分裂に注目した。120 時間中の全ての細胞分裂を計測したところ、炭素線照射細胞では、X 線の場合に比べて回数が減少していることが明らかとなった(表 1)。放射線照射後は G2/M チェックポイントが活性化し、DNA 修復がほぼ完了するまで M 期進行の停止がおこることが知られている。炭素線照射後はチェックポイント活性化による G2/M 停止が X 線照射の場合に比べて長いために、120 時間という限られた観察条件全体としての細胞分裂回数が減少して観察されている可能性も考え、照射

**図4 放射線照射後の分裂期滞在時間**

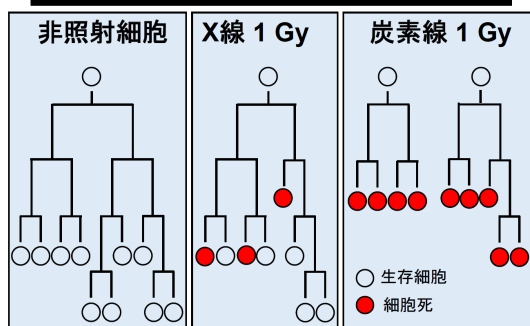


後 1 回目の M 期進行までの時間を X 線、炭素線間で比較したところ、細胞集団として全体で見た場合の平均値には明らかな差は見られなかった(図 2)。このことは、炭素線照射後ではチェックポイントの活性化による G2/M 停止とは別個の理由で M 期を介した細胞周期進行が抑制されている可能性を示唆している。細胞周期進行の観点から、放射線照射後の細胞死が導かれるタイミングを解析したところ、X 線照射後の細胞では、細胞周期が 2 - 3 回進行した後に細胞死の多くがおこるのに対し、炭素線照射後の細胞では、多くの細胞死が初回の M 期終了に伴い引き起こ



されることが明らかとなった(図3)。また、細胞死を導く重篤なゲノム不安定化レベルを解析する目的で、細胞分裂に要した時間を測定したところ、炭素線照射細胞では非照射細胞に比べ、著しく遅延していることが明らかとなった(図4)。このことから、炭素線照射では、照射後初期から細胞分裂を停滞させる重篤なDNA損傷が引き起こされている可能性が示唆された。一方、X線照射細胞では、照射後1回目の細胞分裂では非照射細胞と差は見られず、分裂回数を重ねるにしたがって細胞分裂の停滞が観察されたことから、細胞周期の進行に伴って細胞死の原因となる何らかのゲノム不安定化が増加し、閾値を越えた時点で細胞死が導かれる可能性が示された。さらに、個々の細胞について親細胞から全てのprogenyにわたる挙動を詳細に解析した結果、炭素線照射細胞では、一見増殖を再開したように見える細胞でも、一定期間後に全てのprogenyが死に至るケースがしばしば観察されることが明らかとなった(図5)。これらの結果から、炭素線照射では、X線の

図5 放射線照射後細胞死の代表例



場合と比較して、細胞周期の進行以前に既に致死性の損傷を受けているため、ごく初期の時点で細胞致死の運命決定がなされている可能性が示された。本研究であられた結果は、がん細胞殲滅という観点から、放射線治療における重粒子線の有用性を立証する一助となった。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

1. Hagiwara Y\*, Niimi A\*, Isono M, Yamauchi M, Yasuhara T, Limsirichaikul S, Oike T, Sato H, Held KD, Nakano T, Shibata A. 3D-structured illumination microscopy reveals clustered DNA double-strand break formation in widespread H2AX foci after high LET heavy-ion particle radiation. *Oncotarget*. 8;109370-109381, 2017. 査読有  
doi: 10.18632/oncotarget.22679.
2. Yamauchi M, Shibata A, Suzuki K, Suzuki M, Niimi A, Kondo H, Miura M, Hirakawa

M, Tsujita K, Yamashita S, Matsuda N. Regulation of pairing between broken DNA-containing chromatin regions by Ku80, DNA-PKcs, ATM, and 53BP1. *Sci Rep*. 7;41812, 2017. 査読有  
doi: 10.1038/srep41812.

3. Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, Yoshida Y, Isobe SY, Obuse C, Nishi R, Petricci E, Nakada S, Nakano T, Shibata A. BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation. *Cell Rep*. 18;520-532, 2017. 査読有  
doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.042.
4. Niimi A, Yamauchi M, Limsirichaikul S, Sekine R, Oike T, Sato H, Suzuki K, Held KD, Nakano T, Shibata A. Identification of DNA double strand breaks at chromosome boundaries along the track of particle irradiation. *Genes Chromosomes Cancer*. 55;650-660, 2016. 査読有  
doi: 10.1002/gcc.22367.
5. Oike T\*, Niimi A\*, Okonogi N, Murata K, Matsumura A, Noda SE, Kobayashi D, Iwanaga M, Tsuchida K, Kanai T, Ohno T, Shibata A, Nakano T. Visualization of complex DNA double-strand breaks in a tumor treated with carbon ion radiotherapy. *Sci Rep*. 6;22275, 2016. 査読有  
doi: 10.1038/srep22275.

(\* equal first author)

[学会発表](計 8件)

1. 新美敦子, 萩原慶彦, シリパンリムシリチャイクル, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 中野隆史, 柴田淳史, 重粒子線に特徴的なDNA損傷の可視化と細胞運命決定に与える影響の解析, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017年12月6-9日
2. 新美敦子, 萩原慶彦, シリパンリムシリチャイクル, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 中野隆史, 柴田淳史, 超解像度顕微鏡による重粒子線誘発クラスターDNA二本鎖切断の空間分布解析, 日本放射線影響学会第60回大会, 千葉, 2017年10月25-28日
3. 新美敦子, 萩原慶彦, シリパンリムシリチャイクル, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 中野隆史, 柴田淳史, 超解像度顕微鏡による重粒子線誘発クラスターDNA二本鎖切断の空間的分布の解析, 第89回日本遺伝学会, 岡山, 2017年9月13-16日
4. 新美敦子, 山内基弘, シリパンリムシリチャイクル, 関根峻太, 磯野真由, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 鈴木啓司, 中野隆史, 柴田淳史, 重粒子線照射により誘発され

- る特異なDNA損傷形状の可視化, 第39回日本分子生物学会, 横浜, 2016年11月30日-12月2日
5. Niimi A, Limsirichaikul S, Nakano T, Shibata A, Analysis of DNA synthesis during homologous recombination in G2 cells after ionizing irradiation, The 10th 3R Symposium, Matsue, Japan, 13-17<sup>th</sup> Nov. 2016
  6. Niimi A, Nakako NI, Yamauchi M, Limsirichaikul S, Oike T, Sato H, Jeggo PA, Held KD, Nakano T, Shibata A, Analysis of cluster DNA double strand break formation using high-resolution microscopy. 10th Quinquennial Conference on Responses to DNA damage: from molecule to disease, Egmond aan Zee, The Netherlands, 17-22<sup>nd</sup> Apr. 2016
  7. 新美敦子, 山内基弘, シリパンリムシリチャイクル, 関根峻太, 磯野真由, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 鈴木啓司, 中野隆史, 柴田淳史, 高 LET 重粒子線照射により誘発される2つの異なる染色体間にまたがるクラスターDNA損傷の同定, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2015年12月1-4日
  8. Niimi A, Oike T, Isono M, Hagiwara Y, Yoshida Y, Takahashi A, Nakano T, Shibata A. Visualization of heavy ion induced cluster DNA double strand breaks formation using the super-resolution microscopy. 15th International Congress of Radiation Research. Kyoto, Japan. 25-29<sup>th</sup> May. 2015.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕  
 ホームページ等  
<http://www.giar.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

- (1)研究代表者  
 新美 敦子 (NIIMI Atsuko)  
 群馬大学・未来先端研究機構・助教  
 研究者番号: 50508984
- (2)研究分担者 該当なし  
 ( )  
 研究者番号:
- (3)連携研究者 該当なし  
 ( )  
 研究者番号:
- (4)研究協力者  
 柴田 淳史 (SHIBATA Atsushi)  
 群馬大学・大学院医学系研究科・研究講師  
 研究者番号: 30707633  
 山内 基弘 (YAMAUCHI Motohiro)  
 長崎大学・学内共同利用施設等・助教  
 研究者番号: 60437910